

AZ

English abstract for German (DE) Patent 4113393

Biological test process for biological fluids, e.g. blood - for finding and isolating wound healing or angiogenesis-promoting substances

Patent Assignee: SCHIELE U (SCHI-I)

Inventor: ANDERSEN-BECKH B; ANSSAR-HAEDENKAMP G; KUNTZ G; SCHIELE U

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4113393	A	19921029	DE 4113393	A	19910424	199245 B
DE 4113393	C2	19931014	DE 4113393	A	19910424	199341

Abstract (Basic): DE 4113393 A

Biological test process for finding and isolating wound-healing or angiogenesis-promoting substances from biological (physiological) fluids by qualitative detection and quantitative recording comprises use of self-replicating cells and at least one growth factor. (esp. in concns below optimum concn.) on the wound area.

Test process for determin. and quantification of biological activity of wound healing or angiogenesis-promoting substances, isolated by the above or some other process, comprises use of self-replicating cells and at least one growth factor (in concns. as above) to the wound area.

USE/ADVANTAGE - The process is useful for testing, e.g. blood, wine lymph or milk (whey) in humans or animals. It is cheap and reproducible and does not affect wound healing. The process can also be used for qualitative and quantitative activity determin. of starting materials, intermediates and final prods. of wound healing or angiogenesis promoting preps.

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 13 393 A 1**

⑤1 Int. Cl. 5:
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/15
// C 12 N 5/06, C 12 Q
1/32, 1/42

⑳ Aktenzeichen: P 41 13 393.5
㉔ Anmeldetag: 24. 4. 91
㉕ Offenlegungstag: 29. 10. 92

DE 41 13 393 A 1

㉑ Anmelder:

Schiele, Ulrich, Dr., 8000 München, DE

㉒ Erfinder:

Andersen-Beckh, Bettina, Dr., 3550 Marburg, DE;
Anssar-Haedenkamp, Gesa, Dr., 8000 München, DE;
Kuntz, Günter, Dr., 8032 Gräfelfing, DE; Schiele,
Ulrich, Dr., 8000 München, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉓ Testverfahren für wundheilungs- und angiogenesefördernde Substanzen

㉔ Es wird ein Testverfahren beschrieben, mit dessen Hilfe wundheilungs- bzw. angiogenesefördernde Substanzen aus biologischen (physiologischen) Flüssigkeiten isoliert werden können. Dabei wird die Stimulierung des Wachstums von Endothelzellen in Zellkultur unter suboptimalen Bedingungen, insbesondere von suboptimalen Mengen an Wachstumsfaktor bestimmt.

DE 41 13 393 A 1

Die Erfindung betrifft ein Testverfahren mit dessen Hilfe Substanzen, die die Wundheilung und Angiogenese fördern aus biologischen (physiologischen) Flüssigkeiten isoliert werden können.

Es ist bekannt, daß ein auf bestimmte Art aufbereiteter Anteil von Blut, wie z. B. das Präparat ACTOVEGIN (eingetragenes Markenzeichen) (DE-A-10 76 888, Jaeger und Mittenzwei) die Wundheilung fördert. Die Wundheilung fördernde Wirksubstanz selbst ist jedoch nicht bekannt. Aus dieser Situation ergibt sich die grundsätzliche Schwierigkeit, ein definiertes Präparat herzustellen.

Aufgabe der Erfindung ist daher die Entwicklung eines Testverfahrens mit dessen Hilfe eine oder mehrere wundheilungs- bzw. angiogenesefördernde Substanz/en aus biologischen Flüssigkeiten (z. B. Blut, Lymphe, Urin, Molke usw.) isoliert und deren Struktur dann aufgeklärt werden kann.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche 1 und 2 gelöst.

"Die Wundheilung ist ein sehr komplexer Prozeß, der sich in drei Phasen unterteilen läßt

1. exsudative Phase
2. proliferative Phase
3. Narbenbildung.

Ein erster provisorischer Wundverschluß wird dadurch erreicht, daß das im Bereich der Wunde austretende Blut gerinnt. Danach dringen Granulozyten und Serum in das Wundgebiet ein (exsudative Phase). In der proliferativen Phase sprossen Kapillaren und wandern Fibroblasten, Histiozyten und andere Zellen in das Gerinnsel ein (Bildung eines Granulationsgewebes). In der Phase der Narbenbildung schließlich bilden sich die Kapillaren zurück, und der Defekt wird mit faserreichem Bindegewebe ausgefüllt. Das letztlich vorhandene Narbengewebe ist kapillar- und zellarm" (Thews, Mutschler, Vaupel: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1989, S. 38).

Diese Prozesse setzen eine sehr differenzierte zeitliche Regulation voraus, die zudem örtlich begrenzt und gerichtet ist. Bestimmte Zelltypen wandern in einer bestimmten Phase zu bestimmten Positionen in das Wundgebiet ein. Bestimmte Zelltypen vermehren sich in bestimmten Phasen in bestimmten Anordnungen. Zerstörtes Material im Wundbereich wird abgebaut. In einer bestimmten Phase wird eine neue extrazelluläre Matrix u. a. aus Kollagen aufgebaut.

Die Regulation dieser Prozesse erfolgt zumindest zum Teil durch für die verschiedenen Zellen spezifische Wachstumsfaktoren. Die Strukturen vieler solcher Wachstumsfaktoren wurden bereits aufgeklärt. Die Konzentration dieser Faktoren muß also sowohl lokal als auch zeitlich reguliert sein.

Zur Förderung der Wundheilung sind solche Wachstumsfaktoren deshalb höchstens in Ausnahmefällen geeignet, da sie weder lokal noch zeitlich differenziert appliziert werden können.

Der naheliegende Ansatz wäre es, die Beeinflussung der Wundheilung an Versuchstieren zu untersuchen.

Diese Untersuchungen sind jedoch sehr aufwendig und lassen zudem keine relevanten Ergebnisse erwarten, da bei Tieren im gesunden Zustand die Bedingungen für die Wundheilung ohnehin optimal sind. Die Beeinflussung einer gestörten Wundheilung müßte an kranken oder anders geschädigten Tieren untersucht

werden, was praktisch schwer durchführbar ist.

Das gleiche gilt für die Angiogenese, die Teil der Wundheilung ist, aber auch als isoliertes Phänomen auftritt.

Auf Grund dieser Situation ergab sich die Schwierigkeit einen theoretischen Ansatz für einen zur Erfassung der Wundheilung relevanten Test zu finden.

Es ist bekannt, daß mit Zellkulturen der wachstumsfördernde Effekt von Substanzen demonstriert und quantitativ erfaßt werden kann. Hier gibt es eine große Zahl von Zelltypen und Wachstumsbedingungen (verschiedene Medien, verschiedene Zusätze, Zeit, Haftfläche, Einsatzmenge von Zellen, pH-Wert, usw.).

Auch an der Wundheilung ist eine Vielzahl von Zellen beteiligt. Die Lösung der gestellten Aufgabe wird erst durch die Einführung ganz spezieller Zellkulturbedingungen ermöglicht. Es werden solche Zelltypen eingesetzt, die sich im Wundbereich vermehren, wie Endothelzellen (Gefäßneubildung), Fibroblasten (Bindegewebsbildung), Epithelzellen (äußerer Verschluß der Wunde).

Durch Verwendung eines verarmten Mediums (hitzebehandelte Serumkomponente, suboptimale Konzentration an Wachstumsfaktoren, verringerte Mengen an Aminosäuren, Glucose usw., geringere Konzentration an Sauerstoff) wird eine pathologische Situation simuliert. Substanzen, die unter solchen Bedingungen die Zellvermehrung stimulieren, sind Kandidaten zur Entwicklung von wundheilungs- bzw. angiogenesefördernden Pharmaka.

Die Erfindung wird nun am Beispiel der Untersuchung des niedermolekularen Anteils von Blut ausführlich erläutert.

Endothelzellen werden im verarmten Medium in Kultur gehalten. Der Einfluß verschiedener Zusätze in steigender Konzentration auf die Zellvermehrung ist in der Abb. 1 zusammengefaßt.

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) zeigt dabei im angewendeten Konzentrationsbereich keinen oder nur einen geringen wachstumsfördernden Effekt bei Endothelzellen. Der niedermolekulare Anteil von Blut allein zeigt bis zu sehr hohen Konzentrationen ebenfalls keine oder nur geringe Stimulation des Wachstums. Wird der niedermolekulare Anteil von Blut jedoch zusammen mit EGF eingesetzt, so zeigt sich eine ausgeprägte Stimulation des Wachstums. Dieser Effekt läßt sich mit EGF-Konzentrationen erzielen, die allein keine oder höchstens geringe Stimulierung des Wachstums bewirken. Der niedermolekulare Anteil von Blut hat somit die bemerkenswerte und überraschende Eigenschaft, die Wirkung von EGF zu verstärken.

Im Hinblick auf die Anwendung zur Förderung der Wundheilung bzw. Angiogenese ist gerade diese Eigenschaft von außerordentlicher Bedeutung.

Wie bereits oben ausgeführt, verlaufen die einzelnen Prozesse der Wundheilung zeitlich und räumlich geordnet. Je nach Phase der Wundheilung schwankt die Konzentration eines Wachstumsfaktors in weiten Bereichen. Durch eine Verstärkung dieses streng regulierten Prozesses ist eine Förderung der Wundheilung also möglich, die durch die Applikation des betreffenden Wachstumsfaktors selbst nicht erzielt werden könnte, wie im folgenden dargestellt wird: Dies wird bei der Rolle der Kapillareinsprossung im Wundheilungsprozeß besonders deutlich. In der proliferativen Phase sprossen Kapillaren in das Wundgebiet ein. Die Konzentration der betreffenden Wachstumsfaktoren muß also hoch sein. In der Phase der Narbenbildung erfolgt dagegen ine

Rückbildung von Kapillaren. Die Konzentration der betreffenden Wachstumsfaktoren muß also niedrig sein.

Die Zugabe der entsprechenden Wachstumsfaktoren zur Beeinflussung der Wundheilung würde die Rückbildung der Kapillaren hemmen und den Heilungsprozeß in dieser Phase stören. Durch den verstärkenden Effekt des niedermolekularen Anteils von Blut wird dagegen die Regulation des Heilungsprozesses nicht gestört; die betreffenden Prozesse werden nur verstärkt.

Das angestrebte Ziel, d. h. ein Testsystem mit welchem, unabhängig von individuellen Abweichungen, mit relativ begrenztem Aufwand, eine wundheilungs- bzw. angiogenesefördernde Wirkung reproduzierbar erfaßt werden kann, wird mit der Bestimmung des Wachstums der Endothelzellen unter den beschriebenen Bedingungen erreicht.

Eine mögliche Ausführungsform dieses Tests ist im Beispiel dargestellt. Die Zusammenhänge werden durch die Abbildung veranschaulicht.

Beispiel

Die Isolierung von "capillary endothelial cells" (CEC) aus Meerschweinchenherzen erfolgte nach S. Nees et al., Eur. J. Cell Biol. 24; 287–297 (1981). Die Medien setzten sich wie folgt zusammen:

Sucrosemedium:
20% Sucrose (Merck, Darmstadt) in Medium 199 (Gibco) 37°C;

Kulturmedium:
Medium 199 (Gibco) mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) (Flow Laboratories);

Enzymlösung:
0,1% Collagenase (Sigma, Deisenhofen) und 0,1% Trypsin (Biochrom, Berlin) in PBS-d (Biochrom), 37°C;

PBS-d:
Phosphate-buffered-saline solution ("d" heißt "Ca²⁺- und Mg²⁺-deficient") pH-Wert 7,2

171 mM NaCl
3,35 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄

PBS:
Phosphate-buffered-saline solution, pH-Wert 7,2

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
0,7 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂

Alle Lösungen sollten 100 IU/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Fungizon (alle von Biochrom) enthalten.

Ein aus einem Meerschweinchen (200–300 g) isoliertes Herz wird kanuliert und zuerst retrograd mit 20 ml Sucrosemedium, dann mit 10 ml Enzymlösung perfundiert. Abgelöste mikrovaskuläre Endothelzellen in der Enzymlösung überschichten das Sucrosemedium und lassen sich leicht ernten. Die Zellen aus vier Herzen werden vereinigt und dreimal mit je 50 ml Kulturmedi-

um gewaschen (10 min, 250 g). Sie werden dann in zwei bis vier 35 mm-Petrischalen mit je 2 ml Kulturmedium ausgesät und im feuchten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wird nach 24 h erneuert, danach werden die Kulturen zweimal pro Woche mit frischem Medium gefüttert.

Für die Durchführung des Tests wurden konfluente CEC-Primärkulturen zur Synchronisation drei Tage in Testmedium mit niedrigem Serumgehalt und bovinem Serumalbumin (BSA) (Sigma) (zur Stabilisierung) kultiviert. Dieses Testmedium (nach Nees) bestand aus Medium 199 mit 0,5% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS; Sigma) (56°C, 30 min), 1,7% BSA und Penicillin/Streptomycin/Fungizon (s. o.). Dieses Medium sichert die Anheftung und das Überleben der CEC bei geringer Aussaatdichte, erlaubt aber kaum Wachstum. Danach wurden die CEC in Einzelzellen dissoziiert mit 0,5 ml 0,1% Collagenase/0,1% Trypsin (s. o.), wodurch andere, in geringer Anzahl vorhandene Zelltypen – vermutlich makrovaskuläre Endothelzellen (S. Nees: persönliche Mitteilung) nicht abgelöst werden. Nach der Zellzählung wurde die Zellsuspension in einer Konzentration von 1000 Zellen/well (Napf) mit 0,1 ml Testmedium pro well in Mikrotiterplatten mit 96 Wells ausgesät.

Nach der Aussaat wurden 0,1 ml/well Testsubstanz in Testmedium zugefügt. Wegen der geringen Aussaatdichte benötigen die Zellen keine Erneuerung des Mediums während der folgenden drei Wochen Kultur. Der niedermolekulare Anteil von Kälberblut sowie Fraktionen davon dürfen maximal mit 1 mg/ml (bezogen auf Trockengewicht) eingesetzt werden, höhere Konzentrationen wirken offenbar toxisch (möglicherweise wegen des hohen Salzgehalts). EGF wurde in einer Konzentration von 1 ng/ml verwendet.

Das Wachstum der Kulturen wurde dann durch Zellzählung oder MTT-Test (T. Mosmann, J. Immunol. Meth. 65: 55 (1983), L.M. Green et al., J. Immunol. Meth. 70; 257 (1984)) analysiert. Der MTT-Test mißt die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen. Alternativ läßt sich der Saure-Phosphatase-Test nach Connolly et al. (Analyt. Biochem. 152; 136–140 (1986)) oder der Einbau von ³H-Thymidin verwenden.

Beim MTT-Test werden die Wells mit je 200 µl PBS gespült, dann 30 min bei 37°C mit – pro well – 10 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (Sigma; 5 mg/ml PBS) und 100 µl PBS inkubiert. Nach dem Absaugen und Spülen mit je 200 µl PBS werden die blau angefärbten Zellen mit – pro well – 20 µl 6% SDS (Natriumdodecylsulfat, Sigma) in H₂O und 200 µl 0,04 N HCl in Isopropanol lysiert.

Die Extinktion des gut gemischten Lysats, die linear mit der Zelldichte korreliert, wurde in einem "Multi-skan" (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Zur Ermittlung des Stimulationsfaktors wurde die Extinktion bei 570 nm der jeweiligen Testsubstanz-Konzentration durch die Extinktion bei 570 nm der jeweiligen Kulturen dividiert, die nur Testmedium erhalten hatten.

Die Abbildung illustriert die Dosisabhängigkeit der Wirkung der Testsubstanzen

- niedermolekularer Anteil von Kälberblut
- Kontrollösung (Salze, Aminosäuren, Zucker, Metabolite entsprechend der Zusammensetzung des niedermolekularen Anteils von Kälberblut)
- EGF

auf die Proliferation kapillarer koronarer Endothelzellen (CEC).

Die Abbildung zeigt den Einfluß des niedermolekularen Anteils von Kälberblut auf das Wachstum koronarer kapillarer Endothelzellen.

Primäre kapillare Koronar-Endothelzellen (CEC) wurden in einer Dichte von 1000 Zellen/well in 96 well-Mikrotiterplatten ausgesät und drei Wochen mit 0,2 ml Testmedium kultiviert, das verschiedene Konzentrationen folgender Testsubstanzen enthielt:

1. niedermolekularer Anteil von Kälberblut +1 ng/ml EGF
2. Kontrolllösung + 1 ng/ml EGF
3. EGF
4. niedermolekularer Anteil von Kälberblut
5. Kontrolllösung

Danach wurde die Zelldichte mit dem MTT-Test bestimmt.

Die Abszisse bezeichnet die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen in µg/ml (niedermolekularer Anteil von Kälberblut, Kontrolllösung) bzw. pg/ml (EGF), die Ordinate den Wachstumsstimulationsfaktor, bezogen auf die Zelldichte im Testmedium ohne Testsubstanz. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus 8 Bestimmungen (wells) dar.

Dieser Test ist somit der Schlüssel zur Isolierung der Wirksubstanz(en) aus dem Substanzgemisch des niedermolekularen Anteils von Blut. Mit Hilfe bekannter Anreicherungsverfahren wie Fällungen mit org. Lösungsmitteln, Salzfällungen, Chromatographie an Molekularsieben und Ionenaustauschern, Affinitätschromatographie, HPLC mit normalen und reversed Phasen, lassen sich die Komponenten des niedermolekularen Anteils von Blut auftrennen und mit Hilfe des Tests läßt sich bestimmen, in welchen Fraktionen sich die aktive(n) Substanz(en) befindet(n). Auf diese Weise gelangt man schließlich zur reinen Wirksubstanz, deren chemische Struktur dann aufgeklärt werden kann.

Als Pharmakon hat eine solche Wirksubstanz eine Bedeutung, die weit über die des Substanzgemisches (niedermolekularer Anteil von biologischen Flüssigkeiten wie z. B. Blut) hinausgeht. Mit den sich bei einer solchen Monosubstanz bietenden Untersuchungsmöglichkeiten können die optimale Dosierung und die Bedingungen zur Aufrechterhaltung eines wirksamen Spiegels bestimmt werden. Der therapeutische Nutzen wird somit erhöht. Darüber hinaus kann der Wirkungsmechanismus besser studiert werden, was wiederum zu einer gezielteren Anwendung führt.

Mit dem beschriebenen Testsystem können selbstverständlich entsprechende Wirksubstanzen auch aus anderem biologischem Ausgangsmaterial isoliert werden.

Die gewerbliche Anwendung beschränkt sich nicht darauf, ein Testverfahren zum Screening und zur Isolierung von wundheilungs- und angiogenesefördernden Substanzen entwickelt zu haben. Das Testverfahren kann auch zur qualitativen und quantitativen Aktivitätsbestimmung im Rahmen der Qualitätskontrolle (Ausgangsmaterial, Zwischenprodukt, Endprodukt) von wundheilungs- bzw. angiogenesefördernden Präparaten eingesetzt werden. Dies gilt für präparate mit bekanntem wie mit unbekanntem Wirkprinzip.

Isolieren von wundheilungs- bzw. angiogenesefördernden Substanzen mittels qualitativen Nachweises und quantitativer Erfassung dieser wundheilungs- bzw. angiogenesefördernden Substanzen aus biologischen (physiologischen) Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß im Wundbereich sich vermehrende Zellen im Testverfahren eingesetzt werden und daß wenigstens ein Wachstumsfaktor bevorzugt in suboptimaler Konzentration eingesetzt wird.

2. Testverfahren zur Bestimmung und Quantifizierung der biologischen Aktivität von wundheilungs- bzw. angiogenesefördernden Substanzen, die gemäß dem Verfahren des Anspruchs 1 oder nach sonstigen Verfahren isoliert worden sind, dadurch gekennzeichnet, daß im Wundbereich sich vermehrende Zellen im Testverfahren eingesetzt werden und daß wenigstens ein Wachstumsfaktor bevorzugt in suboptimaler Konzentration eingesetzt wird.

3. Testverfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Wachstumsfaktor vorzugsweise nur ein einziger, der von Fall zu Fall auch unterschiedlich sein kann, oder aber eine Kombination von zwei oder mehreren Wachstumsfaktoren verwendet wird.

4. Testverfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Wachstumsfaktor oder die Wachstumsfaktoren in suboptimaler Konzentration vorliegen.

5. Testverfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1–4, wobei der Wachstumsfaktor epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) ist.

6. Testverfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß die im Wundbereich sich vermehrenden Zellen in einer Kultur mit verarmtem Medium, wie z. B. erniedrigter Serumgehalt, ohne Serumzusatz und/oder Verringerung des Nährstoffangebots, gehalten werden.

7. Testverfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1–6, dadurch gekennzeichnet, daß nur der niedermolekulare Anteil der biologischen Flüssigkeit verwendet wird.

8. Testverfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, daß die niedermolekularen Substanzen aus Blut gewonnen werden, wie z. B. Humanblut, tierisches Blut (Rinderblut, Schweineblut, Pferdeblut usw.).

9. Testverfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1–8, dadurch gekennzeichnet, daß als im Wundbereich sich vermehrende Zellen Endothelzellen oder/und Fibroblasten oder/und Epithelzellen verwendet werden.

10. Testverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Endothelzellen aus koronaren Kapillaren gewonnen werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —

